

④ 日本国特許庁 (JP)
 ④ 公表特許公報 (A)

④ 特許出願公表

昭63-503138

④ 公表 昭和63年(1988)11月17日

④ Int.Cl.
 A 61 K 39/395
 43/00
 45/00

識別記号

厅内整理番号
 L-7252-4C
 7252-4C
 7252-4C *

審査請求有
 予備審査請求有

部門(区分) 3 (2)
 (全 9 頁)

④ 発明の名称 診断および治療用抗体複合体

④ 特 願 昭62-501784
 ④ ④ 出 願 昭62(1987)2月25日

④ 翻訳文提出日 昭62(1987)10月14日
 ④ 国際出願 PCT/US87/00406
 ④ 国際公開番号 WO87/05031
 ④ 国際公開日 昭62(1987)8月27日

優先権主張 ④ 1986年2月25日 ④ 米国(U S) ④ 833,204

④ 発明者 シー、リサ ビー アメリカ合衆国 07009ニュージャージー、シダー グローブ、リッジコート 31

④ 出願人 センター、フォア、モレキュラーエ、メディシン、アンド、イミュノロジー アメリカ合衆国 07103ニュージャージー、ニューヨーク、ブリューストリート 1

④ 代理人 弁理士 赤岡 迪夫

④ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K, F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許), U S

最終頁に続く

各章 文 の 節題 図

1. 少なくとも1個の残存遊離アミノ基を有するポリマー組体へ共有結合した複数分子の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または後出し得る標識分子を含み、担持した前記組体は前記の少なくとも1個のアミノ基を遮して抗体の炭水化物部分へ還元したシップ複合結合によって共有結合されている抗体複合体。
2. 前記抗体はモノクロナル抗体である第1項の抗体複合体。
3. 前記複合体はヒト血清中に可溶である第1項の抗体複合体。
4. 前記組体はアミノデキストランか、または長さが少なくともアミノ酸50個のポリペプチドである第1項の抗体複合体。
5. 前記抗体は抗ガン抗体である第1項の抗体複合体。
6. 前記抗ガン抗体は、肺、乳房、結腸直腸、肝臓、すい臍、尿道癌、胃、腎臓、リンパ腺または表皮細胞癌によってつくられるもしくは関連する抗原へ特異的に結合する第5項の抗体複合体。
7. 前記抗体は非ガン性感染または炎症病変によってつくられるもしくは関連する抗原へ特異的に結合する第1項の抗体複合体。
8. 前記抗体は正常血管もしくは組織の特定タイプに特徴的な抗原へ特異的に結合する第1項の抗体複合体。
9. 前記ポリマーはアミノデキストランである第1項の抗体複合体。
10. 前記アミノデキストランはデキストランと1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンの結合生成物である第9項の抗体複合体。
11. 前記アミノデキストランはその上に約50ないし150個のアミノ基を持っている第9項の抗体複合体。
12. 前記複合体はアミノデキストラン1分子当たりメソトレキセー

- ト約25ないし50分子を有する第11項の抗体複合体。
13. 前記複合体は抗体あたりメソトレキセート-アミノデキストラン部分1ないし3個を有する第12項の抗体複合体。
14. 前記ポリマーは長さが少なくとも50個のアミノ酸のポリペプチド類である第1項の抗体複合体。
15. 前記ポリマー組体は細胞毒剤の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
16. 前記細胞毒剤は抗ガン薬物である第15項の抗体複合体。
17. 前記抗ガン薬物はメソトレキセート、5-フルオロウラシル、シクロヘキシミド、ダウノマイシン、デキソルビシン、クロラムブシル、トレニモン、フェニレンジアミンマスター、アドリアマイシン、ブレオマイシン、シトシンアラビノシドまたはシクロフォスファミドである第16項の抗体複合体。
18. 前記細胞毒剤はトキシンである第15項の抗体複合体。
19. 前記トキシンはリテンもしくはそのA-1段、またはアメリカナマゴボウ抗ビールスタンバクである第18項の抗体複合体。
20. 前記ポリマー抗体は抗生物質の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
21. 前記抗生物質は抗ビールス、抗カビまたは抗微生物である第20項の抗体複合体。
22. 前記抗生物質はマイトマイシン、アクチノマイシンまたはそれらの類似体である第20項の抗体複合体。
23. 前記抗体ポリマーはホウ素付加体の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
24. 前記ホウ素付加体はカルボラン誘導体である第23項の抗体複

特表昭63-503138(2)

合体。

25. 前記抗体ポリマーはキレーターの複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
26. 前記キレーターは放射性金属のキレーターである第25項の抗体複合体。
27. 前記キレーターは磁気共鳴増強金属イオンのためのキレーターである第25項の抗体複合体。
28. 前記キレーターは、(i)エチレンジアミンテトラ酢酸もしくはジエチレントリアミンベンタ酢酸の誘導体か、(ii)デフェロキサミンか、または(iii)1,2-もしくは1,3-ジカルボニル化合物のビスチオセミカルバゾンである第25項の抗体複合体。
29. 前記ポリマー抗体は検出し得る標識の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
30. 前記標識は酵素、蛍光化合物または電子転移剤である第29項の抗体複合体。
31. 同質物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識の複数分子がそれへ共有結合した、そして少なくとも1個の残存アミノ基を有するポリマー抗体を、酸化した炭水化物部分を持っている抗体と反応させる工程、および
由生成するシップ基付加物を還元安定化する工程
を含んでいる抗体複合体の製造方法。
32. (iv)ガンまたは他の病理学的病変によって產生されるまたは関連する抗原へ特異的に結合する、放射標識された抗体と、そして細菌の薬剤に許容し得る注射ビヒクルとよりなるシンチグラフ造影剤組成物において、前記放射標識された抗体が第26項の抗

体複合体である改良。

33. (iv)ガンまたは他の病理学的病変によって產生されるまたは関連する抗原へ特異的に結合する、磁気共鳴増強金属イオンで標識された抗体と、そして細菌の薬剤の薬剤に許容し得る注射ビヒクルとよりなる磁気共鳴造影剤組成物において、前記の標識した抗体は第27項の抗体複合体である改良。
34. (iv)第5項、第7項、第8項、第15項、第16項、第18項、第20項、第23項および第26項のいずれかの抗体複合体と、そして細菌の薬剤の薬剤に許容し得る注射ビヒクルとを含むヒトの差置のための治療組成物。
35. 第1項の抗体複合体を含み、前記ポリマー抗体は検出し得る標識の複数分子を担持しているイムノアッセイまたは免疫組織学のための診断組成物。

四月 十四

診断および治療用抗体複合体

本発明の背景

本発明は、蛋白、トキシン、キレーター、ホウ素化合物および検出し得る標識のような診断または治療成分の抗体への複合体に関し、該診断または治療成分は最初アミノデキストランまたは長さが少なくとも50個のアミノ酸ポリペプチドのようなポリマー抗体へ担持され、そしてこの中間体が抗腫瘍抗体のような目標指向体へ部位特異的に複合化される。生産する複合体は診断または治療成分を目標組織または器官へ指向し、そこで診断または治療効果が実現される。

目標指向治療効果を得るために抗体へ細胞毒物を複合化することは既知である。特に、メソトレキセート(MTX)は抗体へ複合化することができ、そしていくらかの選択性の細胞毒性が標識されたことは既知である。細胞毒物の抗体担持量を増すことにより、そのような複合体の選択性および細胞毒性を増強することが望ましい。しかしながら、一つの抗体への個々の薬物分子多数の複合化は筋肉その免疫反応性を減じ、該影響は薬物約10分子以上が担持される時に見られる。

薬物を抗体へ複合化される中間ポリマー抗体へ複合化することが提案されている。これは薬物分子の多数が抗体自身のより少ない部位において抗体へ結合することができ、そのため免疫反応性がそれほど重大に損傷されないという利点を有する。

一つのアプローチは、Garrett et al., Int. J. Cancer, 31:

661-670, 1983 によって報告されているように、MTXをウシ血清アルブミン(BSA)へ結合し、そして次に中間体を抗体へ不規則に結合することであった。これら著者は BSA(平均分子量70,000)へMTX約37分子を結合することができたが、しかし得られる抗体複合体はもとの抗体のそれの約2.8%だけの免疫反応性を有していた。

ポリマー抗体としてポリリシンの使用は Ryser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 3867-3870, 1978に報告された。これらの著者は抗体あたりMTX1-3分子を結合することができ、そして免疫反応性は貧弱であることを発見した。加えて、大部分標識したアンモニウム基の形にあるポリマーの高いアミン含量は、複合体が正常細胞に付着し、細胞毒効果の選択性を無効にした。

Rouland の米国特許第4,046,722は、細胞毒剤の複数の分子が分子量5000ないし500,000のポリマー抗体へ共有結合され、そして担持した抗体がペンドントアミンもしくはカルボキシル基へのランダム結合によって抗体へ共有結合した抗体複合体を開示する。共有結合は複合体の一方の成分のアミン基と他方の成分のカルボキシル基との間にアミド結合を生ずる直接結合により、または抗体上のアミン基への抗体のアミン基のグルタルアルデヒド結合によって実現される。再びこれは抗体の免疫反応性の損失の不利益と、そして抗体および/または抗体の構造のいくらかのリスクを有する。Ghone et al., J. Natl. Cancer Inst., 61-657-675, 1978は、ガン治療に有用な他の抗体結合細胞毒剤を開示するが、再び共有結合は抗体の酸化した炭水化物部分へではない。これら参考文献は、蛋白担持ポリマー抗体はよく知られていること、しかし過去におけるそれら

特表昭63-503138(3)

の抗体への結合モードは抗体上のペンドントアミンまたはカルボキシル基を介してランダムであったことを示す。

放射性金属および/または磁気共鳴増強剤として作用することができる金属イオンのためのキレート化基は、大部分はポリペプチド鎖上のペンドントアミン、カルボキシル、スルフヒドリルまたはフェニル基へのランダム結合を含む。種々の方法によって抗体へ共有結合されている。トキシンおよびホウ素付加体はまた種的療法のため種々の方法によって抗体へ結合されており、ホウ素基は一旦それらが結合した抗体標的指向抗体によって腫瘍または他の病巣部位へ局在化されたならば熱中性子照射によって活性化される。酵素、DNAセグメント、螢光性化合物等のような検出し得る標識はアッセイに使用するため再びペンドントアミン基へのランダム結合によって抗体へ結合される。

抗体へのランダム結合および架橋の望ましくない効果を回避する試みとして、McKeara らは1983年9月14日に公開されたヨーロッパ特許出願第88,695号において、抗体の炭水化物部分を酸化し、生成したカルボニル基（アルデヒドおよび/またはケトン基）へ遊離アミン基を有する化合物をシップ塩基形成および場合により還元的安定化によって結合することを含む抗体複合体の製造方法を開示する。この文献はキレーター、薬物、トキシン、検出し得る標識等のような種々の化合物の抗体の酸化された炭水化物部分への部位特異性結合を開示する。結合をもっと容易に開拓させるか、または標的部位において開拓に抵抗性とするため、これら化合物と抗体との間のスペーサーを提供するため、短いペプチドリンクーが開示されている。酸化した炭水化物のアミノデキストラムのような

ポリマーへの結合も開示されているが、しかしイヌノアッセイに用いられるような、抗体のポリマー試験ビーズ、プレートまたは管のような不溶性支持体への結合の環境に限られる。この文献には薬物、キレーター等のような標識性分子を担持したポリマー粗体を抗体の酸化した炭水化物部分へ共有結合し、診断剤または治療剤として使用するための可溶性複合体を製造する示唆はない。

従って診断または治療成分を標的組織または器官へ選択的に指向させるため、または高能率および高感度イヌノアッセイまたは免疫組織学的用途のため、免疫反応性の最小の減少を高保持と組合わせる、薬物、トキシン、キレーター、ホウ素化合物または検出し得る標識のような診断的または治療的成分の抗体複合体に対する需要が存在し続ける。

本発明の目的

本発明の目的は、標的部位における診断または治療効果を増強するため、診断または治療成分の複数の分子が抗体へ結合している、標的指向抗体への診断または治療成分の複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、複合体がもとの抗体と実質上同じ免疫反応性を有する、抗体への診断または治療成分の複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、複合体が認知し得るほど非標的細胞または組織へ結合せず、そして薬物またはトキシンの全身副作用を最小化しつつ、標的化複合体が腫瘍細胞または感染部位へ侵入し、または標的部位においてその治療成分を放出し、そして標的にいてその殺腫瘍または抗菌作用を達成する、抗ガンもしくは抗病原抗体への

抗腫瘍性もしくは抗病原性、またはトキシンの複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、シンチグラフまたは磁気共鳴造影のための標的化造影剤として使用するための、またはラジオアイソトープ療法のための標的化治療剤として使用するための、複数のキレーターを含む抗体複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、中性子活性化治療剤として使用するための、複数のホウ素付加体を含む抗体複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、イヌノアッセイまたは免疫組織学のための試験として使用するための、複数の検出し得る標識を含んでいる抗体を提供することである。

本発明の他の目的は、前述の性質を有する抗体複合体を製造する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、診断および治療成分の測定および感染部位への標的化した放出のため前記抗体複合体を使用する、またはイヌノアッセイまたは免疫組織学的用途において増強した放出のため複数の標識を担持する前記複合体を使用する、診断および治療方法を提供することである。

明細書および請求の範囲をさらに検討するとき、本発明のそれ以外の目的および利益は当業者に明らかになるであろう。

本発明の概要

これらの目的は、少なくとも1個の残存アミン基を有するポリマー粗体へ共有結合した複数の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識を含み、担持させた該粗体が前記少なくとも1個のアミン基により抗体の炭水化物部分へ還元したシップ

塩基結合によって共有結合している抗体複合体を提供することによって達成することができる。

本発明はさらに、

- 少なくとも1個の残存アミン基を有し、複数の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識分子がそれへ共有結合したポリマー粗体を酸化した炭水化物部分を有する抗体へ反応させる工程、および
- 生成するシップ塩基付加物を還元的に安定化させる工程を含む抗体複合体の製造方法を含む。

本発明はまた、本発明の抗体複合体を使用する、診断および治療方法を含む。

詳細な説明

本発明による抗体複合体の一般的な製造方法は、その炭水化物部分が酸化されている抗体を、複数の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識を担持し、そして少なくとも1個の遊離アミン官能を有する粗体ポリマーと反応させることを含む。これは当初のシップ塩基（イミン）結合をもたらし、該結合は最終複合体を形成する2級アミンへ還元によって安定化される。

粗体ポリマーは、好みしくはアミノデキストラム（AD）または少なくとも50個のアミノ酸鎖長のポリペプチド（PP）であるが、他の実質上均等なポリマー粗体も使用することができる。最終抗体複合体は、生体内診断または治療剤として使用する時、投与の容易性および効率的な標的化のため、ヒト血清に可溶であることが望ましい。このため粗体ポリマー上の可溶化官能は最終複合体の血清溶解度を増強するであろう。特に、アミン部分上にヒドロキシル官能

特表昭63-503138(4)

を持ったアミノデキストランが好ましいであろう。

アミノデキストランとの複合体の製造プロセスは、通常デキストランポリマー、有効には約10,000ないし100,000、好ましくは約30,000ないし60,000、そしてさらに好ましくは約40,000の平均分子量(MW)のデキストランから出発する。デキストランは次に、アルデヒド基を発生するようにその炭化水素の一一部の制御された酸化を実現するため酸化剤と反応させられる。酸化は慣用操作に従って、細分認化学試薬、例えばNaIO₄によって都合よく実施される。

約40,000のMWのデキストランに対しては約50ないし150、好ましくは約100個のアルデヒド基が、他のMWデキストランについては約同割合のアルデヒド基が発生するように酸化剤の量を調整するのが便利である。アルデヒド基、および後のアミン基の多過ぎる数は、ポリマーがその時ポリリジンのように挙動するので有利でない。少な過ぎる数は薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または標識分子の望ましい担持より少ない担持を生じ、不利である。

酸化したデキストランは次にボリアミン、好ましくはジアミン、およびさらに好ましくはモノまたはボリヒドロキシジアミンと反応させる。適当なそのようなアミンは、例えばエチレンジアミン、プロピレンジアミンまたは類似のボリメチレンジアミン、ジエチレントリアミンもしくは類似のボリアミン、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンもしくは類似のヒドロキシ化ジアミンもしくはボリアミン等を含む。以前の研究者は一般にエチレンジアミンを使用していたが、しかし本発明者らは1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンのような可溶化ジアミンによってより良い結果が得られ

キシン、キレーター、ホウ素付加体および標識に対して類似の工程が使用されるであろう。MTXの活性化は、任意の慣用のカルボキシ活性化試薬、例えばDCCにより、場合によってその後活性エステルを形成するためN-ヒドロキシスクシンイミド(BOS_n)との反応によって便利に実施される。反応は通常極性中性溶媒、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)等で実施される。他の活性化エステル、例えばD-ニトロベンゼート等も混合無水物と同様に使用することができる。DCC/HOS_n活性化は緩和であり、そして活性化したMTXはADと水性溶媒中で反応できるので好ましい。

ADに対する活性化したMTXの割合は、好ましくはAD上の利用できるアミン基の約半数が活性化MTXのカルボキシル基とアミド結合をつくるような割合である。このようにもし約40,000の出発MWを持っているAD上に約100のアミン基が利用可能であれば、これらの約50までが活性化MTXと反応しなければならない。MTX:AD約50:1の割合を使用し、MTX約25ないし50分子が通常導入される。付加物の溶解度減少によるその初期沈殿のため、より高い担持を達成することは困難である。

他の薬物のために使用すべき改良の例示として、5-フルオロウラシル(5-FU)の担持は5-フルオロウラシルをその炭化水素において例えば過ヨウ素酸塩を使用して酸化し、この中間体をアミノデキストランと反応させ、そしてシップ塩基付加物を還元安定化することによって実行することができる。シクロヘキシミドは、そのシクロヘキサンカルボニルのアミノデキストランアミン基との直接反応と次に還元安定化か、またはその側鎖ヒドロキシルをジ

ることを示した。アルデヒド官能のシップ塩基(イミン)基への実質上完全な変換を確実にするため、アルデヒド基に対して過剰のアミンが使用される。

生成する中間体の還元的安定化は、シップ塩基中間体を還元剤、例えばNaBH₄、NaBH₃Cl 等と反応させることによって実施される。イミン基の2級アミン基への実質上完全な還元と、そして未反応アルデヒド基のヒドロキシル基への還元を確実にするため、過剰の還元剤が使用される。生成する付加物は、架橋したデキストランを除去するため慣用のライジングカラムの通過によってさらに精製することができる。AD上の利用し得る1級アミン基の数の推定は秤量したサンプルとトリニトロベンゼンスルホン酸との反応および420 nmにおける光学密度の標準との相関関係によって実施することができる。この方法は通常アルデヒド基の計算数のAD上の1級アミン基への実質上完全な変換をもたらす。

アミン官能を導入するためのデキストランの他の慣用の誘導体化方法、例えば臭化シアノとの反応および続いてジアミンとの反応も使用することができる。

ADは次に中間付加体を形成するため、例えばジクロヘキシルカシルボジイミド(DCC)またはその水溶性誘導体を使用し、慣用手段によって開裂した活性化形、好ましくはカルボキシル活性化誘導体の形の、担持すべき特定の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体、または標識の誘導体と反応させる。

メソトレキセート(MTX)は本発明による複合体製造に使用するための典型的な薬物であり、そして操作を例証するために使用されるであろう。当業者には自明な適当な方法で修飾した他の薬物、ト

キシン、キレーター、ホウ素付加体および標識に対して類似の工程が使用されるであろう。MTXの活性化は、任意の慣用のカルボキシ活性化試薬、例えばDCCにより、場合によってその後活性エステルを形成するためN-ヒドロキシスクシンイミド(BOS_n)との反応によって便利に実施される。反応は通常極性中性溶媒、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)等で実施される。他の活性化エステル、例えばD-ニトロベンゼート等も混合無水物と同様に使用することができる。DCC/HOS_n活性化は緩和であり、そして活性化したMTXはADと水性溶媒中で反応することができる。

他の例証は抗生物質マイトマイシンCおよびその類似体によって提供される。この分子はアミン官能と環状イミンとを有し、そのどちらもアルキル化活性化基、例えばスクシニイミジルオキシオドアセテートまたはスルフォスクシニイミジルオキシ(4-イオドアセチル)アミノベンゾエートと反応させることができ、生成する中間体は次にアミノデキストラン上のアミン基をアルキル化するため使用される。代わりに、カルボキシル基を例えば無水コハク酸を使用して導入し、次に例えばDCCにより活性化し、そして活性化した中間体を前のように連結することができる。

トキシン、例えばアメリカマゴボウ抗ビールスタンバク(PAP)またはリチンA-チューン等は、グルタルアルデヒド縮合により、またはタンパクの活性化したカルボキシル基のアミノデキストラン上のアミンとの反応によってアミノデキストランへ結合することができる。

ポリペプチド担体をADの代わりに使用することができるが、しかしそれは鎮中にアミノ酸を少なくとも50個、好ましくは100ないし500個のアミノ酸を持たなければならない。これらアミノ酸の少なくともいくつかはリジン残基か、またはペンドントカルボキシル基を有するグルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基でなければ

ればならない。リジン残基のペンドントアミンおよびグルタミン酸およびアスパラギン酸のペンドントカルボキシルは、蛋白、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または標識分子をリポリマーへつけるのに便利である。適当なそのようなPPの例は、例えばリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、それらの共重合体、およびこれらアミノ酸とそして生成した阻持した粗体と抗体複合体へ所望の溶解性質を与えるための他のもの、例えばセリンとの混合ポリマーを含む。

前に挙げた特定例のほかに、腫瘍細胞またはヒトに感染し病変を起こすことがある微生物に対し細胞毒効果を有する多数の蛋白およびトキシンが知られている。それらはメルクインデックス等の蛋白およびトキシンの要約に見られる。任意のそのような蛋白をこの分野で良く知られた慣用の手段によってADまたはPP上へ阻持することができ、そして前記のものの類似によって例証される。

放射性金属または磁気共鳴増強剤のためのキレーターはこの分野でよく知られている。典型的例はエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)およびジエチレントリアミンベンタ酢酸(DTPA)の誘導体である。これらは典型的にはその頭部にキレーターが粗体へそれによって結合し得る基を持っている。そのような基は例えばペソノイルイソチオシアネートを含み、それによってDTPAまたはEDTAは抗体のアミン基へ結合することができる。本発明においては、この同じ基がADまたはPP上のアミン基へキレーターを連結するために使用される。代わりに、キレーター上のカルボキシル基またはアミン基は、すべて良く知られた方法によって活性化により、またはあらかじめ誘導体とそして次にカップリングによってADま

たはPPへ結合することができる。例えば、G a - 67に対するキレーターであるフェロキサミンは、グルクレートまたはアスバルテート残基を含んでいるPPの活性化カルボキシル基へ連結できる、または活性化カルボキシル、イソチオシアネットもしくは類似の基を含むように適当なリンカーで活性化し、そしてリジン残基をその中に持っているADまたはPP上のアミンへ結合することができる遊離アミノ基を持っている。

ADのアミンへキレーターを連結するための他の方法はキレーターの官能に応じる者には自明であろう。粗体のアミンまたはカルボキシル基へのそのような連結は既知であり、そしてADまたはPP粗体ボリマーへの連結に容易に適応させることができる。キレーター上の他の官能も、例えばスルフヒドリルへはアルキル化によりチオエーテルの形成、ヒドロキシルへはアシル化により好ましくはウレタンもしくはエステルの形成、芳香環へは後で粗体へカップリングするためカルボキシルまたはアミンへ変換し得る基ヘジアゾカップリングのように自明であろう。

酵素、螢光化合物、電子伝移剤および類似物のような標識もこの技術分野において良く知られた慣用方法によって粗体へ連結することができる。これらから製造した標識した粗体と抗体との複合体は、標識の粗体への直接結合によって製造した粗体複合体のように、イムノアッセイまたは免疫組織学に使用することができる。しかしながら、本発明により複合体の複数の標識の粗体は、標的抗原への抗体の低い程度しか得られないアッセイまたは組織学的操作の感度を増大することができる。

ホウ素付加体、例えばカルボランは、抗体へ結合させそして消滅

へ標的化させる時、熱中性子照射によって活性化し、高い標的毒性短距離効果を生ずるアルファ線放出によって崩壊する放射性原子へ変換することができる。ホウ素付加体と、そして磁気共鳴増強剤の高阻持はそれらの効果を強めるのに非常に重要である。カルボラン類は、この技術において良く知られているようにペンドント頭部上のカルボキシル官能を持つようにつくることができる。このカルボキシル基の活性化と粗体上のアミンとの結合によるこれらカルボランのADまたはPPへの結合は、有用な阻持粗体の製造を可能とする。

抗体との付加体の複合化は、抗体の炭水化物部分を酸化し、そして生成したアルデヒド(またはケトン)カルボニルを阻持後粗体上に残っているか、または蛋白、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または標識を阻持後それへ導入されたアミノ基と反応させることによって実現される。典型的には、ADのアミンのすべては該粗体の阻持に使用されず、そして残っているアミンは酸化した粗体と結合してシップ基付加物を形成し、それは通常水素化ホウ素還元剤により還元安定化される。

例えば、MTX-AD付加体は、メソトリキセート法によるとする腫瘍によって生成もしくは関連する抗原へ特異的に結合する任意の抗体へ複合化させることができる。そのような抗原の例は、ヒトヒューマンゴナドトロビン(HCG)、ガン胎児性抗原(CEA)、アルファフェトタンパク(APP)、乳房粗大のう胞病タンパク、乳房上皮細胞抗原、および他の乳房、肺、卵巣、生殖細胞、脳、リンパ腫および白血病抗原である。そのような抗原に対する抗体は、適当な動物宿主を経験した抗ガン抗原または腫瘍もしくは正常器官

/組織および/または細胞で免疫化することによって発生させることができる。

これらの抗原および/または細胞はモノクロナル抗体を生産するハイブリドーマを製造する慣用方法に使用することもできる。ヒトまたは靈長類ハイブリドーマモノクロナル抗体は、遺伝子工学およびハイブリドーマ技術の組合せによって製造することができる。

次の工程は、複合体のために選定した抗体の炭水化物部分の酸化を含む。これは化学的、例えばNaIO₄または他の縮合剤により、または酵素的、例えばニューラミニダーゼおよびガラクトースオキシダーゼによって便利に実施される。後者は例えばBanjo et al., Int. J. Cancer, 13: 151-155, 1974に報告されているように、アミノ部分を抗体へ連結するために良く知られた便利な方法である。

酸化した抗体とMTX/AD付加物の割合は、平均約1~3倍の付加物が抗体へ連結されるように調整される。これは複合体のMWを約300,000以下にし、これは細胞取扱および固体表面への沈殿を妨害することなく適切な阻持を増強し、同時に血液から複合体の急速な排出を回収または少なくとも軽減するに望ましい。分子の炭水化物部分へ部位特異性選擇でMTX-AD複合体の抗体への結合は、抗体結合活性を保存し、同時に蛋白の高阻持を許容する。

本発明によって他の複合体を製造するためには類似の置換が使用される。阻持したPP粗体は、好ましくは抗体の酸化した炭水化物部分との結合のために残っている遊離リジン残基を持っている。粗体上のカルボキシルは、もし必要なら例えばDCCによる活性化とそしてジアミンの過剰との反応によってアミンへ変換することができる。

ある。

抗体への薬物の担持は薬物の力価、担体標的化の効率、そしてその標的へ到達したときの複合体の有効性に依存するであろう。大部分の場合、担体上に少なくとも20、好ましくは50、そしてしばしば100以上の薬物の分子を担持させることができたい。本発明による複合体として、薬物をそれが標的中部分的にまたは完全に無毒化する能力は、該薬物の全身的副作用を減らし、そして複合化しない薬物の全身的投与が許容されないときその使用を許容する。例えば、MTXおよびシクロヘキシミドはしばしば全身的に投与する時あまりに毒性である。しかし担体上で抗体へ複合した薬物の多くの分子の投与は全身毒性を軽減しながら療法を可能にする。

トキシンは薬物よりしばしばより少なく担持されるであろうが、しかしそれは担体へなおトキシンを少なくとも5、好ましくは10および場合によって20分子以上担持し、そして標的化放出のため抗体へ少なくとも1個の担体チーンを担持するのが有利である。

先に述べたように、特にキレート化すべき金属イオンが磁気共鳴増強用の常磁性イオンである時は、担体へキレーターの多数の分子を担持させ、複合体を形成することが高度に有利である。そのような場合、高分子量担体ポリマー鎖が好ましく使用され、そして2個以上の担持担体が抗体の炭水化物部分へ結合される。例えば、平均分子量100,000のデキストランからつくったAD、好ましくは2-ヒドロキシ-1,3-ジアミノプロパンからつくったAD、および好ましくはデキストランあたり約100ないし200アミノ基を含んでいるADを用い、慣用のサイクリックDTPA操作を用い、または倒錐上に活性化したカルボキシルを有する、または倒錐上に他の

反応性アシル化基、例えばイソチオシアネートを有する、または倒錐上にアルキル化官能、例えばアルファードベンジルもしくはヨードアルキル基を有する他の誘導体の過剰と反応させることにより、約100倍のDTPAキレーター基が連結される。抗体の酸化した炭水化物部分へのいくつかの担持した担体ポリマーチューン、好ましくは1.5ないし4チューーンの連結は、キレーター複合体が慣用手段により、好ましくは金属不溶液中においてそしてトランスキレート化剤を使用して金属イオンで担持された後、单一抗体上に1.5ないし400個の常磁性イオンの担持を許容するであろう。

生体内診断および治療用途のための本発明の抗体複合体の投与は、診断もしくは治療成分が抗体へ直接連結している、または担持した担体が抗体のアミノ酸残基上のアミンもしくはカルボキシル基へ非部位特異性担体でランダムに結合することによって連結されている、同一または類似の薬物、トキシン、キレーター、またはホウ素付加体の複合体に類似の方法によるであろう。そのような投与モードは例証目的のためにここに既に引用した参照中に例示されており、そして文献に広く見られるであろう。そのためそれらは当業者に良く知られているであろう。もっと精密な投与法がそれぞれの剂について、再びこの分野で良く知られているように必要であろう。

MTX-AD-Abの投与は、処理すべき腫瘍のタイプおよび位置に応じて種々の方法で実施することができる。例えば、投与は静脈内、動脈内、腹腔内、胸膜内、包膜内、皮下、局所カテーテルを通じて注入、または直接の病巣内注射によることができる。

複合体は一般にリン酸緩衝食塩水中の無菌水溶液として投与されるであろう。複合体約10ないし200mgの投与単位が通常毎日

数日の期間投与されるであろう。患者の感受性を減らすため、投与量を減らすか、および/または他のスペシスからの抗体および/または低アレルギー性抗体、例えば混成ヒトもしくは重異型抗体を使用することが必要となり得る。

静脈内、動脈内、または胸膜内投与は通常肺、乳房および白血病腫瘍のために使用される。腹腔内投与は卵巢腫瘍に推奨される。包膜内投与は脳腫瘍および白血病に推奨される。皮下投与はネジキンス病、リンパ腫および乳ガンに推奨される。カテーテル注入は転移した肺、乳房または肝臓の生殖細胞癌に有用である。病巣内投与は肺および乳房病巣に有用である。

上記例示は本発明による複合体の一般的な投与方法を示すであろう。熱中性子活性化療法のためのホウ素付加体担持担体の複合体は同様な方法で通常実施され、そして中性子放射が実施される前に非標的化複合体が消失するまで持つことが有利であろう。そのような消失は例えば米国特許第4,624,846から知られているように、第2の抗体の使用によって加速することができる。

さらに考究することなく、当業者は以上の説明を使用して、本発明をその全範囲にわたって利用することができるものと信じられる。使って以下の好ましい具体例は単に例示と考えるべきであり、記載の限部の限定と考えてはならない。以下の実施例においてすべての濃度は未精正の濃度で表わされ、特記しない限りすべての部およびペーセントは重量による。

実施例1

アミノデキストランの製造

デキストラン(BW 40,000 ジグマ) 1gをポリアルデヒドデキス

トランを精製するように水溶液中で NaIO₄ (0.33g) で部分酸化する。混合物を暗所で室温で1時間かきませる。溶液をアミコンセル (YM-10膜、MWCO=10,000) によって濃縮し、セファデックスG-25カラムによって精製する。物質を凍結乾燥し、白色粉末 8.98g (收率 8.9.8%) を得る。

ポリアルデヒドデキストラン (800mg、0.02ミリモル) をBzO 8.0mlに落し、次に1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン (200mg、2.15ミリモル) と室温で24時間反応させる。水素化ホウ素ナトリウム (11.8mg、0.311ミリモル) を加え、室温で24時間反応させる。物質を YM-10および XM-50を通して膜口通し、小分子を除き、同時に分子量を決定した結果に照應する。

アミノ基のレベルを参照物質としてグルコサミンを用い、TNBS (トリニトロベンゼンスルホン酸) によってアッセイする。NH₂レベルは 100/デキストランと対照される。

実施例2

メソトレキセート/アミノデキストラン中間体の製造

(a) メソトレキセートの活性化

乾燥反応ペイアル中へ、無水DMF中のメソトレキセート 4.5.4mg (0.1ミリモル、シグマ) を注射器で導入する。無水DMF 7.5-9.0μl中のN-ヒドロキシシクシニミド (23mg、0.2ミリモル、シグマ) 溶液と、無水DMF 7.50μl中の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (41.5mg、0.2ミリモル、シグマ) の溶液を加える。反応混合物を暗所で無水条件下室温で16時間かきませる。白色沈澱を遠心し、透明溶液をシールしたびん中に-20℃で貯える。
b) アミノデキストランとの反応

特表昭63-503138(7)

アミノデキストラン (10mg , 2.5×10^{-4} ミリモル) を 2ml の PBS, pH 7.2 中に溶かす。活性化した MTX (125×10^{-4} ミリモル) を徐々に加える。溶液を室温で 5 時間かきませ、そしてセファデックス G-25 カラムによって精製する。ボイド容積を基め、反応組成液に対して透析する。透析乾燥後、製品 2.1mg (収率 21%) が得られる。メソトレキセート結合は 370nm における吸収により、 38メソトレキセート/デキストラン であると決定される。

実施例 3

抗体複合体の製造

(a) 抗体の酸化

抗 CEA モノクローナル抗体をメタ過ヨード酸ナトリウムによって選択的に酸化し、脱水化物部分上にアルデヒド基を生成させる。操作は以下のとおりである。PBS, pH 7.2 中の抗体 ($2\text{mg}/\text{ml}$) をメタ過ヨード酸ナトリウム ($2.84\text{mg}/\text{ml}$) $20\mu\text{l}$ と暗所中室温で 90 分間反応させる。次にエチレングリコール ($2\mu\text{l}$) を加える。15 分後酸化した抗体をセファデックス G-25 カラムによって精製する。IgG 分画を基め、約 1mg に濃縮し、以下の複合化に使用する。

(b) 複合化

酸化した抗体 (約 2mg) を PBS, pH 7.2 中の実施例 2 に従って製造したメソトレキセート/アミノデキストラン中間体 (2.5mg , 62.5×10^{-4} ミリモル) と反応させる。溶液は 4 度で 48 時間反応させる。生成するシップ塩基を水素化シアノホウ素 (抗体より 10 倍過剰) により安定化する。セラククリル S-300 上のライジングクロマトグラフィーの後、複合体は対照ピークとして現れ、そして並め

られる。タンパク濃度はローリーアッセイによって 1.05mg (収率 52.5%) であると決定される。メソトレキセートの濃度は 370nm ($= 6500$) における吸収によって決定される。この複合体は IgG 分子あたりメソトレキセート 91 分子を含有することが見られ、これは少なくとも 2 個のデキストラップリッジが抗体へ結合していることを示す。

この複合体の免疫反応性を間接的蛍光標識技術を使用してフローサイトメトリーによって調べる。データを未修飾抗体と比較し、そしてこの方法による複合化は抗体の免疫反応性を変えないことを示す。

実施例 4

5-FU 抗体複合体の製造

平均分子量 10,000 のポリリジンを過ヨード酸塩で酸化した 5-フルオロクリジンと反応させる。総合生成物を水素化ホウ素ナトリウムで還元安定化する。担持した PP はポリマー上に平均 40 個の 5-FU 基を有する。担持した粗体と酸化した抗体との実施例 3 に類似の操作による複合は、1 ないし 3 個の粗体グループが結合した複合体をつくる。

実施例 5

キレート複合体の製造

分子量 100,000 のアミノデキストランをサイクリック DTPA と反応させ、その上に平均 100 DTPA を有する担持粗体をつくる。生成した担持粗体と酸化した抗体との複合、続いて還元安定化は、免疫反応性の無視し得る減少を伴って抗体あたり 1 ないし 3 個の粗体グループを得た複合体を与える。

ガドリニウム (III) イオンによる、またはインジウム-111、ガリウム-67、テクネチウム-99m による粗体の担持はシンチグラフまたは磁気共鳴造影のための高度に担持された複合体をつくる。例えばイットリウム-90 の担持は治療的に有用な標的化剤をつくる。

実施例 6

MTX 複合体の細胞毒性

L5174T (結腸アデノカルチノーマ) 細胞をトリプシン/EDTA で処理し、完全培地 (RPMI-1640, 10% FCS, $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ ベニシリン, $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン, 25mM Hepes) で洗い、そして各処理について 6 粗体づつ $100\mu\text{l}$ 中 4×10^3 細胞/ウェルにおいてマイクロタイターウエルストリップへ加える。4 時間、37°C, 5% CO₂ の後、抗体-メソトレキセート複合体を適当な対照 (遺伝 MTX、遺伝 MTX + 遺伝抗体) と共に加える。細胞を追加の 24 時間 37°C, 5% CO₂ においてインキュベートし、その後 ^{3}H -セレノメチオニン $0.1\mu\text{Ci}$ を 1 ないし 1.8 時間加える。プレートは 4 回洗浄する。個々のウェルを分離し、ガンマカウンターでカウントする。約 $3\mu\text{M}$ の投与量における複合体は細胞死亡率約 50% を生ずる。

実施例 7

腫瘍治療

肺の両方の葉に拡散転移した小細胞カルチノーマを有する婦人患者を $1.0\text{mg}/\text{kg}$ の濃度で PBS 中 MTX-AD-抗 CEA 抗体複合体 100mg の溶液の静注によって処置する。処置前および複合体最終投与 30 日後の CAT 診査は腫瘍体積の 60% 減少を示す。

以上の実施例は、本発明の一般的にまたは特定期に記載した反応

剤および/または作業条件をもって以上の実施例に使用したものと置き換えることによって同様の成功度をもってくり返すことができる。

以上の説明から、当事者は本発明の必須の特徴を容易に確かめることができ、その精神および範囲を逸脱することなく、種々の用途および条件に適応させるため、本発明の種々の改変および修飾をなすことができる。

手続補正書

特許庁長官 殿 昭和63年8月/8日

1. 事件の表示
PCT/US87/00406
2. 発明の名称
診断および治療用抗体複合体
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
名 称 センター・フォア、モレキュラー、メディシン、アンド、イミュノロジ
4. 代理人
住 所 大阪市東区淡路町2丁目40番地4
弘栄ビル 電話(06) 222-0547
5. 氏 名 (6036) 弁理士 赤岡達夫
6. 補正命令の日付
自 免
7. 補正による増加する発明の数 なし
8. 補正の対象
請求の範囲
9. 補正の内容
別紙のとおり

方 式
審査

12. 前記複合体はアミノデキストラン1分子当たりメソトレキセート約25ないし50分子を有する第11項の抗体複合体。
13. 前記複合体は抗体あたりメソトレキセート-アミノデキストラン部分1ないし3個を有する第12項の抗体複合体。
14. 前記ポリマーは長さが少なくとも50個のアミノ酸のポリペプチド鎖である第1項の抗体複合体。
15. 前記ポリマー担体は細胞毒剤の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
16. 前記細胞毒剤は抗ガン薬物である第15項の抗体複合体。
17. 前記抗ガン薬物はメソトレキセート、5-フルオロウラシル、シクロヘキシミド、ダウノマイシン、デキソルビシン、クロラムブシル、トレニモン、フェニレジジアミンマスター、アドリアマイシン、ブレオマイシン、シトシンアラビノシドまたはシクロフォズファミドである第16項の抗体複合体。
18. 前記細胞毒剤はトキシンである第15項の抗体複合体。
19. 前記トキシンはリチンもしくはそのA-鎖、またはアメリカナマゴボウ抗ヒールスタンパクである第18項の抗体複合体。
20. 前記ポリマー抗体は抗生物質の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
21. 前記抗生物質は抗ビールス、抗カビまたは抗微生物である第20項の抗体複合体。
22. 前記抗生物質はマイトイマイシン、アクチノマイシンまたはそれらの類似体である第20項の抗体複合体。
23. 前記抗体ポリマーはホウ素付加体の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。

1. 少なくとも1個の残存遊離アミノ基を有するポリマー担体へ共有結合した複数分子の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る複数分子を含み、担持した前記担体は前記の少なくとも1個のアミノ基を通じて抗体の炭水化物部分へ還元したシップ塩基結合によって共有結合されている抗体複合体。
2. 前記抗体はモノクロナル抗体である第1項の抗体複合体。
3. 前記複合体はヒト血清中に可溶である第1項の抗体複合体。
4. 前記担体はアミノデキストランか、または長さが少なくともアミノ酸50個のポリペプチドである第1項の抗体複合体。
5. 前記抗体は抗ガン抗体である第1項の抗体複合体。
6. 前記抗ガン抗体は、肺、乳房、結腸直腸、肝臓、すい臓、尿性器、胃、腎臓、リンパ腺または表皮細胞ガンによってつくられるもしくは関連する抗原へ特異的に結合する第5項の抗体複合体。
7. 前記抗体は非ガン性感染または炎症病変によってつくられるもしくは関連する抗原へ特異的に結合する第1項の抗体複合体。
8. 前記抗体は正常器官もしくは組織の特定タイプに特徴的な抗原へ特異的に結合する第1項の抗体複合体。
9. 前記ポリマーはアミノデキストランである第1項の抗体複合体。
10. 前記アミノデキストランはデキストランと1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンの縮合生成物である第9項の抗体複合体。
11. 前記アミノデキストランはその上に約50ないし150個のアミノ基を持っている第9項の抗体複合体。

24. 前記ホウ素付加体はカルボラン誘導体である第23項の抗体複合体。
25. 前記担体ポリマーはキレーターの複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
26. 前記キレーターは放射性金属のキレーターである第25項の抗体複合体。
27. 前記キレーターは磁気共鳴増強金属イオンのためのキレーターである第23項の抗体複合体。
28. 前記キレーターは、(a)エチレンジアミンテトラ酢酸もしくはジエチレントリアミンベンタ酢酸の誘導体か、(b)デフェロキサミンか、または(c)1,2-もしくは1,3-ジカルボニル化合物のビステオセミカルバゾンである第25項の抗体複合体。
29. 前記ホリマー担体は検出し得る複数の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
30. 前記複数は酵素、螢光化合物または電子転移剤である第29項の抗体複合体。
31. (a)薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る複数の複数分子がそれへ共有結合した、そして少なくとも1個の残存遊離アミノ基を有するポリマー担体を、酸化した炭水化物部分を持っている抗体と反応させる工程、および
生成するシップ塩基付加物を還元安定化する工程
を含んでいる抗体複合体の製造方法。
32. 無菌の医薬学的に許容し得る注射用ビヒクルに担持されたシンググラフ造影剤の形の第26項の抗体複合体。
33. 無菌の医薬学的に許容し得る注射用ビヒクルに担持された磁気

特表昭63-503138(9)

国學問素報告

共鳴造影剤の形の第27項の抗体複合体。

34. 無菌の皮剝離的に許容し得る注射用ビニカルに担持されたヒト
の抗原のための治療組成物の形の第5項、第7項、第8項、第1
5項、第16項、第18項、第20項、第23項、および第26
項の抗体複合体。

35. 免疫組織学のための診断組成物の形の第29項の抗体複合体。

I. CLASSIFICATION OF SECURITY MATTER as defined herein:		International Application No. PCT/US87/00406	
SECRET		SEARCHED EXAMINED SEARCHED AND MADE AVAILABLE TO THE EXAMINER BY THE DOCUMENTS RECEIVED BY THE INTERNATIONAL SEARCHING BODY	
(1) (4) CROW 15/000, 17/005, 17/100, 20/100, 20/105, 38/64 US CL. 532/391, 5091, 426/751.1, 133/7, 13-25, 277, 153, 152		SEARCHED EXAMINED SEARCHED AND MADE AVAILABLE TO THE EXAMINER BY THE DOCUMENTS RECEIVED BY THE INTERNATIONAL SEARCHING BODY	
U.S. 532/391, 5091; 426/751.1; 133/7, 13-25, 277, 153, 152		SEARCHED EXAMINED SEARCHED AND MADE AVAILABLE TO THE EXAMINER BY THE DOCUMENTS RECEIVED BY THE INTERNATIONAL SEARCHING BODY	
REMARKS: Standard form from International Examination to the Examiners that such documents are disclosed in the Form Specified.			
II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**			
Category**		Country of Origin*** Name of Document, ** with reference, where expression, of the relevant invention**	
C		Published in Class No. **	
Y	US.A. 4,263,579 (ESKA) Published 21 APRIL 1981.	1-15	
Y	US.A. 4,313,851 (MAGNECO) Published 16 FEBRUARY 1982.	1-15	
Y	US.A. 4,046,732 (BOMLAND) Published 06 SEPTEMBER 1977.	1-15	
Y	US.A. 4,093,607 (ESKA) Published 06 JUNE 1978.	1-15	
X	EP.A. 0,081,695 A2 (CYCLOM CORPORATION) Published 14 SEPTEMBER 1983.	1-15	
** Standard form of what documents:**			
** All documents of the general area of the art which is not specifically mentioned in the application, but which may be of interest to the international examiner.			
** Other documents not published on or after the international filing date, which may be of interest to the international examiner.			
** Documents from other countries which contain an abstract, or a summary, or a translation of the document, or which contain a detailed reference to an earlier document, can, without loss of generality, be considered as part of the prior art.			
** Documents published prior to the international filing date but later than the priority date, which contain an abstract, or a summary, or a translation of the document, or which contain a detailed reference to an earlier document, can, without loss of generality, be considered as part of the prior art.			
** Patent documents published after the international filing date, or documents published before the international filing date, but which contain an abstract, or a summary, or a translation of the document, or which contain a detailed reference to an earlier document, can, without loss of generality, be considered as part of the prior art.			
** Documents containing a statement of the problem to be solved by the claimed invention, or which contain a detailed reference to an earlier document, can, without loss of generality, be considered as part of the prior art.			
** Documents containing a detailed reference to an earlier document, can, without loss of generality, be considered as part of the prior art.			
** The name of the member of the same patent family			
III. RECORDATION			
Date of the Action of the International Searching Body		Date of filing of the International Search Report	
10 MAY 1987		01 JUN 1987	
Signature of the International Searching Body		Signature of the International Examining Body	
IRPA/US		STEVEN E. Schaefer FREDERIC E. SCHAEFER	

第1頁の続き

Digitized by

A 61 K 49/00
C 07 K 15/12
17/08
17/10
G 01 N 33/53
33/54

識別記号

厅内整理番号

C - 6742-4C
8318-4H
8318-4H
8318-4H
A - 7906-2G
A - 7906-2G

◎ 明 売 ブリスコ エフ ジエニウス

アメリカ合衆国08867ニュージャージー、ピツツタウン、ボックス
6. エルディー1

◎登 開 者 ゴニルデンバーグ、エム テー

アメリカ合衆国07078ニュージャージー、ショートヒルズ、ロング

ビッド

ヒルドライブ 397